

KFK-67

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

SEPTEMBER 1961

KFK 67

INSTITUT FÜR STRAHLENBIOLOGIE

INAKTIVIERUNG VON NEUROSPORAKONIDIEN DURCH RONTGENSTRAHLEN
UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN

HERBERT MILTENBURGER, HANS BAUER



KERNREAKTOR

BAU- UND BETRIEBS-GESELLSCHAFT M. B. H.

KARLSRUHE

Sonderdruck aus
STRALENTHERAPIE
Band 116, Heft 1 (1961)

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG / MÜNCHEN UND BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Inaktivierung von Neurosporakonidien durch Röntgenstrahlen unter verschiedenen Bedingungen

Von

Herbert Miltenburger und Hans Bauer

Mit 6 Abbildungen

Einleitung

Bei der Bestrahlung lebender Organismen mit ionisierenden Strahlen wird — neben anderen Phänomenen — eine Inaktivierung der Zellteilungstätigkeit beobachtet. Durch quantitative Untersuchungen, speziell durch die Analyse von Dosiseffektkurven, wurde schon vielfach versucht, Informationen über den eigentlichen Inaktivierungsprozeß sowie über die Orte in der Zelle zu erhalten, in denen dieser Prozeß lokalisiert ist. Dabei ist auch die Frage diskutiert worden, inwieweit eine einzelne Energieabsorption („Treffer“) im Zellkern zur Inaktivierung der Zelle führt, da der Zellkern als wichtigster Träger der genetischen Substanz mit seinen zahlreichen, den Ablauf vieler Prozesse regelnden Steuerfunktionen als besonders strahlensensibel angesehen wird. Ein bei solchen Untersuchungen mehrfach verwendetes Material bilden die Makro- und Mikrokonidien von *Neurospora*. *Giles* (1951) bestrahlte wäßrige Suspensionen von Mikrokonidien zweier Stämme des Askomyzeten *Neurospora crassa* mit 250-kVp-Röntgenstrahlen. Bei der Auswertung seiner Versuche fand er eine Inaktivierungskurve vom Typ einer Mehrtrefferkurve. Als Extrapolationswert („Treffbereichszahl“) wurde ein Wert $n \approx 4$ ermittelt. Nun sind Mikrokonidien aber stets einkernig. Wenn die Inaktivierung der Konidien ausschließlich die Folge eines strahleninduzierten Letalschadens im Zellkern ist, dann folgt aus dem Ergebnis, daß zur Inaktivierung im Durchschnitt jeder Kern mindestens viermal getroffen werden muß. *Atwood* und *Mukai* (1954) untersuchten die Inaktivierung von Neurosporakonidien durch ionisierende Strahlen mit einer speziellen Technik. Heterokaryotische Makrokonidien, die mindestens zwei genetisch verschiedene Zellkerne pro Konidium besitzen, wurden bestrahlt und dann auf verschiedenen Medien ausplattiert. Durch diese Methode konnte bei den Inaktivierungsversuchen näher unterschieden werden zwischen dem Überleben ganzer Zellen und dem „Überleben“ von Zellkernen. *Atwood* und *Mukai* deuten ihre Ergebnisse dahin, daß die Inaktivierung der Konidien ausschließlich auf einem strahleninduzierten letalen Kernschaden beruht. Die Schädigung der Kerne selbst soll nach einem Eintreffervorgang erfolgen.

8. DEZ. 1961

KERNREAKTOR
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. b. H.
Verwaltung der Zentralbücherei

Gafford (1958) hat die Inaktivierung von Makrokonidien, die im Mittel mehrkernig sind, und von Mikrokonidien, die immer einkernig sind, von *Neurospora crassa* durch Co^{60} -Gammastrahlen untersucht. Er kam zu folgenden Ergebnissen: Makrokonidien werden in wäßriger Suspension bis zu einer Dosis von etwa 60 kr durch einen bestimmten Prozeß, den *Gafford A* nennt, inaktiviert. Dieser Prozeß soll die Folge einer strahleninduzierten letalen Kernschädigung sein. Der Teil der Überlebenskurve, der dem Prozeß A entspricht, nach $D = 0$ extrapoliert, liefert den Extrapolationswert $n = 1,9$, was in guter Übereinstimmung steht mit der durchschnittlichen Anzahl von Kernen pro Konidium ($K = 1,85$). Im höheren Dosisbereich fällt die Überlebenskurve steiler ab. *Gafford* interpretiert diesen Befund in Übereinstimmung mit einem von *Atwood* und *Norman* (1949) vorgeschlagenen Modell. Danach soll im höheren Dosisbereich ein zweiter, von Prozeß A unabhängiger Inaktivierungsprozeß B zusätzlich zur Wirkung kommen. Als Extrapolationswert für diesen Prozeß B wurde ein Wert von $n = 5,6$ ermittelt. Der Prozeß B läßt sich somit mit der Anzahl der Zellkerne und damit im Rahmen des Modells mit den Zellkernen nicht in Verbindung bringen. Bei der Inaktivierung von Mikrokonidien hat *Gafford* einen analogen Befund erhalten. Bis zu einer Dosis von 35 kr werden die Konidien durch den angenommenen Prozeß A inaktiviert. Als Extrapolationswert dieses Teils der Überlebenskurve wurde $n = 1$ ermittelt, d. h., dieser Prozeß A könnte wiederum als Kerninaktivierungsprozeß aufgefaßt werden. Im höheren Dosisbereich fällt die Überlebenskurve dann steiler ab. Hier würde also der oben schon erwähnte zweite zusätzliche Inaktivierungsprozeß B einsetzen. Als Extrapolationswert dieses Kurvenabschnittes errechnete sich wie bei Makrokonidien ein n von 5,6.

Für den Mechanismus der Energiezufuhr zu den sensiblen Einheiten der Zelle bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten: Die Energie wird entweder direkt in der sensiblen Einheit oder in deren unmittelbaren Umgebung absorbiert („direkter Treffer“), oder die Energie wird nicht in der sensiblen Einheit selbst oder deren unmittelbaren Umgebung, sondern an einem anderen, davon entfernten Ort absorbiert. Dort durch die Bestrahlung gebildete diffusible Agentien gelangen durch Diffusion zu den empfindlichen Einheiten, reagieren mit diesen und können so eine Inaktivierung herbeiführen („indirekter Effekt“). Bei der Bestrahlung von Wasser mit ionisierenden Strahlen werden Radikale gebildet, die vielleicht einen Strahlenschaden im Sinne eines indirekten Effekts hervorrufen können. Das Ausmaß eines solchen durch Wasserradikale hervorgerufenen indirekten Effekts läßt sich in manchen Fällen und in gewissem Umfange dadurch ermitteln, daß man die betreffenden Objekte einmal bei vollem Wassergehalt, zum anderen in getrocknetem Zustand bestrahlt. *Gafford* hat eine solche Trennung für die Inaktivierung von Makrokonidien versucht. Die Dosiseffektkurve der Inaktivierung von getrockneten Makrokonidien ist charakteristisch verschieden von der Inaktivierungskurve für in Wasser suspendierte Makrokonidien. Es ergab sich, daß bei der Inaktivierung getrockneter Makrokonidien durch ionisierende Strahlen nur der Prozeß B wirksam zu sein scheint. Danach wäre bei Anwendung der eben erwähnten Kriterien Prozeß B eine Folge direkter Treffer und Prozeß A, der ausschließlich als Kerninaktivierungsprozeß gedeutet wurde, eine Folge indirekter Treffer.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, durch vergleichende Untersuchungen an mehreren Stämmen von *Neurospora crassa* weiteres Material für die doch noch nicht sehr befriedigende Deutung der Inaktivierungsvorgänge beizubrin-

gen. Ferner sollte versucht werden, aus den Resultaten von Experimenten, in denen Konidien während der Bestrahlung in einer wäßrigen Lösung von Cystein suspendiert sind, nähere Informationen über den möglichen Wirkungsmechanismus von SH-Schutzsubstanzen zu erhalten.

Material und Methode

Als Versuchsorganismus diente, wie erwähnt, der Askomyzete *Neurospora crassa*. Zur vegetativen Vermehrung werden von dem Pilz zwei Typen asexueller Sporen produziert: Makro- und Mikrokonidien. Makrokonidien besitzen eine variierende Anzahl von Zellkernen, solche mit 2 oder 3 Kernen sind am häufigsten. Mikrokonidien sind stets einkernig. Bestimmte Stämme produzieren nur Makrokonidien, andere Stämme bilden nur Mikrokonidien aus. Diese Konidien stellen das eigentliche Versuchsobjekt dar. Es wurden folgende Stämme von *Neurospora* verwendet: W 2/49 A und Y 74 A (St. Lawrence), beides Makrokonidien bildende Wildtypstämme; K 3/17 ad⁻ (38 701) inos⁻ (37401) dist., ein ebenfalls Makrokonidien produzierender biochemischer Doppelmutantenstamm, in der Folge mit K 3/17 bezeichnet, ferner der Mikrokonidienstamm Y 8743-21-(13-7)-2a, Wildtyp, in der Folge mit Y 8743 bezeichnet.

Alle Versuche wurden in einem durch Klimaanlage auf + 25° C gehaltenen Laboratorium durchgeführt. Die Stämme W 2/49 A, Y 74 A und Y 8743 wurden auf p-minimal-Medium nach *Westergaard* (1947) gezüchtet, der Doppelmutantenstamm K 3/17 auf sogenanntem Myzelmedium nach *Kolmark* (1953). Dieses Medium besteht aus Fries-minimal-Medium, dem vor dem Autoklavieren 10 mg Adenin, 6 mg Meso-Inosit und 15 g Myzel (von Y 74 A) pro Liter zugesetzt werden. Die Kulturen wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kölbchen gezogen, die mit je 20 ml Medium gefüllt waren. Zur Beimpfung wurden auf der abgetrockneten Oberfläche des Mediums 0,2 ml einer dicken Konidien-suspension gleichmäßig verteilt. Danach kamen die Kulturen zunächst für 24 Stunden auf + 35° C und anschließend 6 Tage auf + 25° C. Um hinsichtlich des Alters homogenes Material zu erhalten, wurden in die Versuche nur Konidien genommen, die von 7 Tage alten Kulturen stammten. Zur Ernte der Konidien überschichteten wir die Kulturen mit je 30 ml sterilem destilliertem Wasser und schüttelten nach Zugabe von Glasperlen mäßig stark. Die entstandene dicke Konidien-suspension filtrierten wir durch eine Schicht Watte, um Myzelreste und Mediumreste aus der Suspension abzutrennen. Die als Filtrat anfallende reine Konidien-suspension wurde dann zweimal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und durch Verdünnen mit Aqua dest. auf die gewünschte Konzentration eingestellt. In fast allen Versuchen arbeiteten wir mit Konidienkonzentrationen zwischen 10⁶ und 10⁷ Konidien/ml. Die jeweilige Konzentration konnte durch Zählen in einer Blutzählkammer recht genau bestimmt werden.

Als Strahlenquelle diente in allen Versuchen eine Röntgenröhre vom Typ Müller MG 150, die mit 150 kV und 20 mA ohne zusätzliches Filter betrieben wurde. Die Bestrahlung der wäßrigen Konidien-suspensionen erfolgte in einem zylindrischen Plexiglasgefäß, das nach der Ferrosulfatmethode in gleicher Anordnung und Geometrie wie bei den Bestrahlungsversuchen gegen ein Schlauchkammer-Dosimeter und eine Kondensator-Ionisationskammer geeicht worden war. Die Abweichungen zwischen den verschiedenen Meßanordnungen betragen etwa 3%. Die mittlere Dosisleistung in der Konidien-suspension beziehungsweise am Ort der trockenen Konidien betrug 3500 r/min. Die Füllung des Gefäßes bei den Bestrahlungsversuchen war mit 12 ml immer gleich. Während der Bestrahlung wurde die Suspension durch leichtes Einblasen von Luft, die mit Wasserdampf gesättigt war, gerührt und so eine Sedimentation der Konidien vermieden. Außerdem wurde durch diese Anordnung erreicht, daß die Sauerstoffkonzentration in der Suspensionsflüssigkeit während der Bestrahlung annähernd konstant blieb.

Als Maß der Strahlenwirkung diente das „Überleben“ eines Konidiums, das durch die Fähigkeit definiert war, in entsprechendem Medium eine Kolonie zu bilden, und folgen-

dermaßen bestimmt wurde. Nach der Bestrahlung verdünnten wir die Konidiensuspensionen in einer Verdünnungsreihe bis zu der gewünschten Konzentration. Beim Ausplattieren wurde jeweils 1 ml Suspension in eine Petrischale gegeben, durch geeichte Ausströmdüsen flüssiges Medium in die Platten gegossen und mit der Konidiensuspension gut durchmischt. Die Temperatur des Mediums betrug dabei $+44^{\circ}\text{C}$. Die Schichtdicke des Mediums in den Platten wurde auf 3 mm eingestellt. Dadurch konnten die Nährstoffbedingungen in allen Platten annähernd konstant gehalten werden. Von jeder Versuchscharge wurden in der Regel 10 Platten angelegt, diese nach dem Ausplattieren 6 Tage lang bei $+25^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln bebrütet und dann die entstandenen Kolonien gezählt. Das verwendete Medium unterschied sich natürlich für die einzelnen Stämme in seiner Zusammensetzung. Die Stämme W 2/49 A, Y 74 A und Y 8743 wurden auf Sorbose-minimal-Medium ausplattiert. Dieses Medium bedingt ein kolonieförmiges Wachstum. Der Doppelmutantenstamm K 3/17 kam auf supplementiertes Fries-Medium. Dieser Stamm wächst wegen seines „distinctus“-Allels immer in Kolonieform.

Zur Trocknung der Konidien mußte eine geeignete Methode speziell entwickelt werden; denn die sonst übliche Methode der Gefriertrocknung überlebten maximal 0,3% der Konidien. Auch durch Zusatz von verschiedenen Schutzkolloiden ließ sich die Überlebensrate der getrockneten Konidien auf höchstens 2% steigern. Wesentlich bessere Resultate liefert folgendes Verfahren: 7 Tage alten Kulturen entnimmt man mit einer sterilen Platinnadel Myzel, das zu diesem Zeitpunkt reichlich mit Konidien besetzt ist, indem man es vorsichtig von der Mediumunterlage abhebt und in kleine zylindrische Plexiglasgefäße überführt. Die Proben bringt man für 24 Stunden in einen Thermostaten und trocknet sie bei $+45^{\circ}\text{C}$. Um eventuell vorhandene Restfeuchtigkeit zu entfernen, wird anschließend bei etwa 10^{-2} Torr Unterdruck und Raumtemperatur 3 Stunden lang nachgetrocknet. Diese Methode ist, bezogen auf den Wasserentzug, der Gefriertrocknung mindestens gleichwertig, und 80 bis 100% aller keimungsfähigen Konidien überleben diesen Trocknungsprozeß.

Die Bestrahlung der getrockneten Konidien erfolgte in den kleinen Plexiglasgefäßen, in denen die Konidien schon getrocknet wurden. Um in jeder Probe eine genau gleiche Dosisleistung zu erzielen, waren die einzelnen Gefäße während der Bestrahlung auf einer rotierenden Scheibe befestigt, deren Achse sowohl mit der Achse der Ionisationskammer als auch mit dem Zentrum des Strahlenbündels zusammenfiel. Auch diese Anordnung wurde nach der Ferrosulfatmethode geeicht. Nach der Bestrahlung wurde jede Charge des getrockneten Konidien-Myzel-Gemisches in Wasser aufgeschwemmt, durch Watte filtriert und die Konzentration der so entstandenen Konidiensuspensionen in jeder Probe mit Hilfe einer Blutzählkammer bestimmt. Daraufhin wurde auf entsprechende Stufen verdünnt und, wie oben beschrieben, ausplattiert.

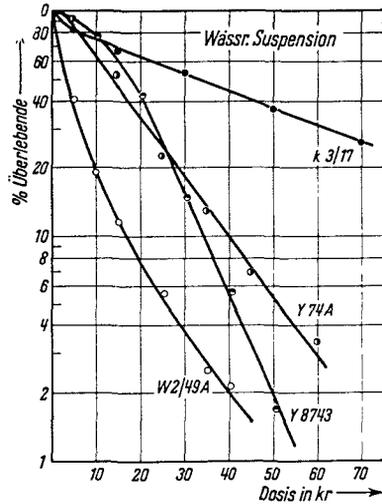
Um die mittlere Anzahl Zellkerne pro Konidium zu bestimmen, wurden Konidien der einzelnen Stämme von 7 Tage alten Kulturen in Carnoy-Lösung fixiert, die Zellkerne nach der Feulgen-Methode gefärbt und jeweils an etwa 2000 Konidien Kernzählungen vorgenommen.

Ergebnisse

1. Bestrahlung von wäßrigen Konidiensuspensionen

Die ersten Versuchsreihen über den Verlauf der Inaktivierung in wäßriger Suspension mit steigenden Dosen von Röntgenstrahlen wurden mit Makrokonidien des Wildtypstammes W 2/49 A durchgeführt. Der Verlauf der Dosis-effektkurve ist in Abbildung I wiedergegeben. Kurven dieses Verlaufes lassen sich als modifizierte Eintrefferkurven auffassen; einer quantitativen Auswertung sind sie schwer zugänglich. Um zu sehen, wie andere Stämme reagieren, wurde als nächstes Versuchsobjekt der ebenfalls Makrokonidien produzierende Wildtypstamm Y 74 A gewählt. Den gleichen Stamm benutzte auch Gafford bei seinen Untersuchungen. Die hier resultierende Dosis-effektkurve ist vom Typ

Abb. 1. Erläuterung im Text.



einer Mehrtrefferkurve (Abb. 1). Die Neigung des linearen Teils der Kurve (im halblogarithmischen Koordinatensystem) errechnete sich mit $b = -0,0269$ (bezogen auf eine Dosisangabe in kr). Der lineare Teil der Kurve, nach $D = 0$ extrapoliert, gibt als Schnittpunkt mit der Ordinate einen Wert für $n = 1,19$. Dieser Wert n soll im folgenden als „Extrapolationswert“ bezeichnet werden. Anschließend wurde der Verlauf der Inaktivierung von Mikrokonidien des Stammes Y 8743 in wässriger Suspension untersucht. Gafford benutzte den gleichen Mikrokonidienstamm. Die Dosiseffektkurve, die wir aus diesen Versuchen erhielten, ist vom Typ einer Mehrtrefferkurve. Als Extrapolationswert wurde $n = 3,58$ erhalten, als Neigung für den linearen Teil der Kurve $b = -0,0458$ (Abb. 1). Schließlich wurde auch die durch Röntgenstrahlen induzierte Inaktivierung von Makrokonidien des Doppelmutanten Stammes K 3/17 in wässriger Suspension untersucht. Bei der statistischen Auswertung ergab sich, daß die Inaktivierung der Makrokonidien, dargestellt im halblogarithmischen Koordinatensystem, im Dosisbereich von 5 bis mindestens 70 kr einem linearen Verlauf folgt. Die Neigung des linearen Teils der Kurve beträgt $b = -0,00757$ (der Extrapolationswert $n = 0,87$; Abb. 1). Bei einzelnen Versuchsreihen wurden bestrahlte Makrokonidien nicht auf Sorbose-minimal-Medium ausplattiert, sondern auf Sorbose-complete-Medium. Dieses Medium enthält alle Substanzen, die zum Wachstum wahrscheinlich aller biochemischen Mangelmutanten nötig sind. In keinem Falle wichen die Überlebensraten aus diesen Versuchsreihen signifikant von denen anderer Reihen ab. Daraus folgt, daß im vorliegenden Fall die Rate der durch Röntgenstrahlen induzierten lebensfähigen Vorwärtsmutanten nur sehr gering sein kann.

2. Bestrahlung von getrockneten Konidien

In diesen Versuchsreihen wurde die Inaktivierung getrockneter Konidien der Stämme W 2/49 A und Y 74 A (Makrokonidien) und des Mikrokonidienstammes Y 8743 durch Röntgenstrahlen untersucht und dabei Dosiseffektkurven erhalten, die denen aus den Bestrahlungsexperimenten mit wässrigen Konidien-suspensionen in ihrem Verlauf ähnlich sind. Um in einer Konidienpopulation

den gleichen Prozentsatz Konidien zu inaktivieren, sind bei der Bestrahlung im getrockneten Zustand jedoch höhere Strahlendosen erforderlich als in wäßriger Suspension. Diesen Tatbestand beschreibt man oft durch einen sogenannten Dosisreduktionsfaktor. Dieser ist definiert als der Quotient der beiden Strahlendosen, die — bei Bestrahlung unter verschiedenen Versuchsbedingungen — den gleichen Effekt erzielen. Bei der Inaktivierung getrockneter Konidien des Stammes W 2/49 A wurde eine Dosiseffektkurve erhalten, die sich formal als modifizierte Eintrefferkurve beschreiben läßt (Abb. 2). Der mittlere Dosisreduktionsfaktor, bezogen auf die Inaktivierung in wäßriger Suspension, beträgt etwa 2,5. Bei der Inaktivierung von getrockneten Konidien des Stammes Y 74 A ergibt sich eine Dosiseffektkurve vom Typ einer Mehrtrefferkurve. Der lineare Teil der Kurve beginnt im Dosisbereich von 15 kr und ist durch eine Neigung von $b = -0,0137$ charakterisiert (Abb. 2). Als Extrapolationswert wurde $n = 1,3$ ermittelt. Der mittlere Dosisreduktionsfaktor beträgt etwa 2,1. Bei den Versuchen über die Inaktivierung getrockneter Mikrokonidien des Stammes Y 8743 fällt der außerordentlich große Dosisreduktionsfaktor von etwa 6 auf. Auch in diesem Fall scheint ein Inaktivierungsverlauf in Form einer Mehrtrefferkurve vorzuliegen. Die Neigung des linearen Kurventeils errechnete sich zu $b = -0,00338$, als Extrapolationswert $n = 1,1$ (Abb. 2). Diese Versuche zeigen, daß Trocknung einen gewissen Schutzeffekt gegen die Inaktivierung durch ionisierende Strahlen bewirkt. Auf die Interpretation dieses Befundes wird später noch einzugehen sein.

3. Bestrahlung von wäßrigen Konidiensuspensionen unter Zusatz von Cystein

Die Versuche, in denen das Ausmaß eines Schutzeffektes von L-Cystein (puriss. Base, Fluka A.G.) gegen die Inaktivierung durch Röntgenstrahlen festgestellt werden sollte, wurden mit Makrokonidien der beiden Stämme W 2/49 A und Y 74 A sowie mit Mikrokonidien des Stammes Y 8743 durchgeführt. Bei Vorversuchen zeigte sich, daß Cystein auf die Konidien der einzelnen Stämme in unterschiedlichem Maße toxisch wirkt. Die Toxizität von Cystein ist abhängig von der Konzentration der Lösung und von der Zeit, während der die Konidien

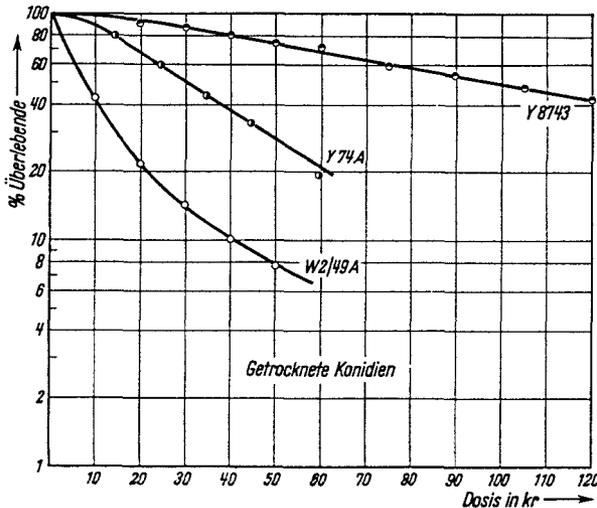


Abb. 2. Erläuterung im Text.

in der Cysteinlösung suspendiert sind. Eine so stark ausgeprägte toxische Wirkung, daß sie bei unseren Versuchen zu berücksichtigen war, zeigte das Cystein allerdings nur bei W 2/49 A, während bei Y 74 A überhaupt kein und bei Y 8743 nur ein minimaler toxischer Effekt gefunden wurde. *Hollaender* und *Stapleton* (1953) zeigten, daß der Schutzeffekt mit steigender Konzentration des Schutzstoffes bis zu einem gewissen Maximalwert wächst. Es wurden daher erst die Konzentrationen von Cystein für die einzelnen Stämme ermittelt, die einerseits einen möglichst großen Dosisreduktionsfaktor liefern, andererseits aber nicht zu toxisch sind, so daß noch hinreichend viele Konidien die Cysteinbehandlung überleben. Folgende Cysteinkonzentrationen haben einen optimalen Schutzeffekt (bezogen auf obige Forderung) gegen die Inaktivierung von Konidien durch Röntgenstrahlen ergeben: W 2/49 A: 0,001 mol, Y 74 A: 0,05 mol und Y 8743: 0,01 mol. Diese Konzentrationen wurden in allen Versuchen mit Cysteinlösungen verwendet. Eine Erhöhung der jeweiligen Cysteinkonzentration brachte bei den einzelnen Stämmen keine weitere Steigerung des Schutzeffektes mehr.

Die Cysteinvorbehandlung der Konidien erfolgte stets einheitlich. Die Methoden der Kultivierung und Ernte waren die gleichen wie bei den Konidien, die in reiner wäßriger Suspension bestrahlt wurden. 15 Minuten vor der Bestrahlung zentrifugiert man 13 ml einer wäßrigen Konidiensuspension ab und dekantiert das überstehende Wasser. Genau 10 Minuten vor Beginn der Bestrahlung werden die Konidien in 13 ml Cysteinlösung wieder aufgeschwemmt und nach guter Durchmischung 12 ml dieser Aufschwemmung in das Bestrahlungsgefäß gegeben. Sofort nach der Bestrahlung zentrifugiert man die Konidiensuspension ab, dekantiert die überstehende Cysteinlösung und wäscht die Konidien zweimal mit sterilem destilliertem Wasser, um das Cystein möglichst quantitativ zu entfernen. Während dieses Vorganges sind oft Verluste von Konidien nicht zu vermeiden. Deshalb bestimmt man die verbleibende Konzentration an Konidien in jeder Charge erneut durch Zählen in einer Blutzählkammer. Danach werden die einzelnen Proben verdünnt und, wie bereits beschrieben, ausplattiert. Um bei der Berechnung der Inaktivierungsrate einen Bezugswert zu erhalten, führten wir bei jedem Versuch 2 Kontrollen mit: Die Verweilzeit der Konidien in der Cysteinlösung war bei Kontrolle 1 gleich der kürzesten Bestrahlungszeit + 10 min, bei Kontrolle 2 gleich der längsten Bestrahlungszeit + 10 min. Da die Unterschiede zwischen den beiden Proben in keinem Versuch erheblich waren, wurde bei der Berechnung des Bezugswertes das Mittel aus beiden Kontrollen zugrunde gelegt.

Die Versuche ergaben Dosiseffektkurven, die den für die verschiedenen Stämme bereits bei den Bestrahlungsversuchen mit reinen wäßrigen Suspensionen und getrockneten Konidien gefundenen ähnlich verlaufen: Bei dem Stamm W 2/49 A wiederum eine modifizierte Eintrefferkurve, bei den beiden anderen Stämmen Mehrtrefferkurven. Der Extrapolationswert ist für Y 74 A $n = 1,3$, für den Mikrokonidienstamm Y 8743 $n = 2,0$. Die Neigung des linearen Teils der Kurve beträgt für Y 74 A $b = -0,0162$ und für Y 8743 $b = -0,03$ (Abb. 3). Zusatz von Cystein bewirkt also einen gewissen Schutzeffekt gegen die Inaktivierung von Konidien durch Röntgenstrahlen in wäßriger Suspension. Der Dosisreduktionsfaktor, bezogen auf die Inaktivierung in wäßriger Suspension, beträgt für W 2/49 A etwa 2,2, für Y 74 A etwa 1,8 und für Y 8743 etwa 1,3. Auf die Interpretation dieses Befundes wird noch näher eingegangen.

4. Bestrahlungsversuche mit weiteren „Schutzstoffen“

Aus Versuchen mit Viren ist bekannt (*Latarjet* u. *Ephrati*, 1948), daß Bouillon, ähnlich wie Cystein, einen Schutzeffekt gegen die Inaktivierung durch

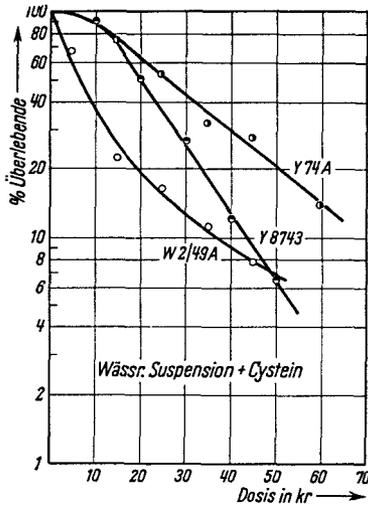


Abb. 3. Erläuterung im Text.

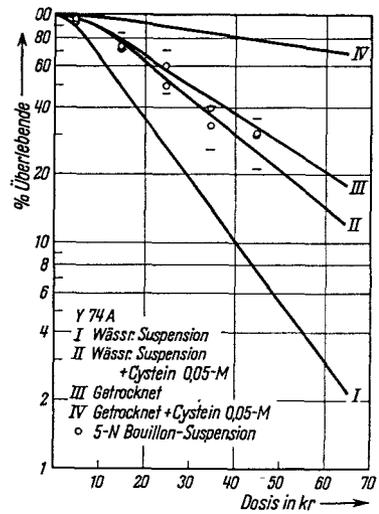


Abb. 4. Erläuterung im Text.

Röntgenstrahlen in wässriger Suspension ergibt. In je 2 Versuchsreihen wurden Konidien der beiden Stämme Y 74 A (Makrokonidien) und Y 8743 (Mikrokonidien) in Bouillon bestrahlt. Nach der Ernte wurden die Konidien in 4⁰/iger Nährbouillonlösung aufgeschwemmt und anschließend bestrahlt. Nach der Bestrahlung kamen die in Bouillon suspendierten Konidien dann ohne weitere Behandlung in die Verdünnungsreihe und anschließend zum Ausplattieren. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Bestrahlung von Konidien, die in Bouillon suspendiert sind, Überlebensraten erhalten werden, die im Bereich der aus den Cysteinversuchen in wässriger Suspension erhaltenen Daten liegen (Abb. 4 u. 5). Dieses Ergebnis zeigt, daß zumindest bei den Stämmen Y 74 A und Y 8743 der Schutzeffekt von Cystein gegen die Inaktivierung von Konidien in wässriger

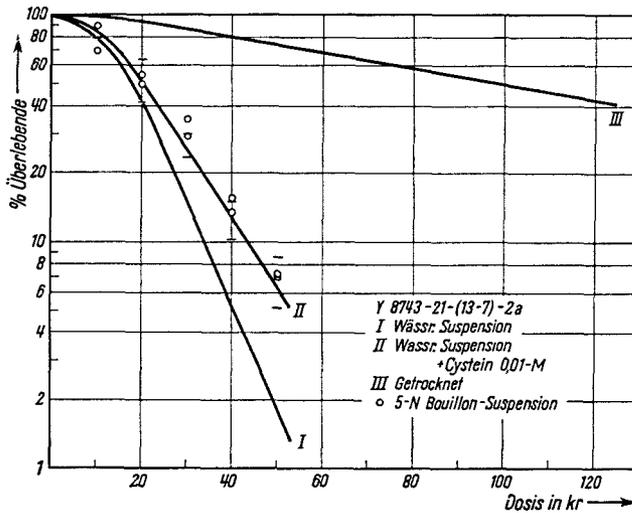
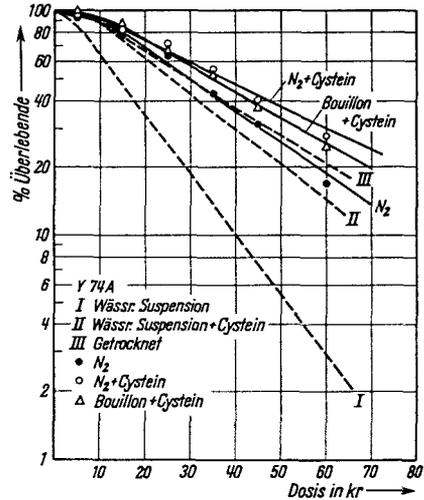
Abb. 5.
Erläuterung im Text.

Abb. 6. Erläuterung im Text.



Suspension in der gleichen Höhe liegt wie der Schutzeffekt, den eine Bouillonlösung gegen die Strahleninaktivierung ausübt.

Im Anschluß daran wurde untersucht, ob sich bei der Bestrahlung von Konidien, die in sauerstoffarmem Wasser suspendiert sind, ein Schutzeffekt zeigt. Dieser „Sauerstoffeffekt“ ist von Bestrahlungsversuchen mit Bakterien und Zellsuspensionen bekannt. Die Konidien wurden — wie bei den bisherigen Bestrahlungsversuchen in wäßrigen Suspensionen — geerntet und in sterilem destilliertem Wasser suspendiert. Bereits 5 Minuten vor Beginn wie auch während der Bestrahlung wurde in die Konidien suspension reiner, O₂-freier Stickstoff (Durchleiten durch Pyrogalllösung) eingeleitet. Nach der Bestrahlung erfolgte, genau wie bei den Versuchen mit belüfteten wäßrigen Suspensionen, die Verdünnung und das Ausplattieren. In diesen Versuchen fanden nur Konidien des Stammes Y 74 A Verwendung. Auch hier zeigte sich ein Schutzeffekt gegen die Inaktivierung durch Röntgenstrahlen. Der Dosisreduktionsfaktor, bezogen auf die Inaktivierung von O₂ enthaltender wäßriger Suspension, beträgt etwa 2,1. Die Inaktivierungskurve ist wiederum vom Typ einer Mehrtrefferkurve und weist in ihrem linearen Teil eine Neigung von $b = -0,0156$ auf; als Extrapolationswert wurde $n = 1,6$ ermittelt (Abb. 6).

Um noch weitere Einzelheiten der Schutzwirkung kennenzulernen, wurde der Schutzeffekt verschiedener Schutzstoffe auch in kombinierter Anordnung untersucht. In diesen Versuchen verwendeten wir ebenfalls nur Konidien des Stammes Y 74 A. Bei der Untersuchung des kombinierten Schutzeffektes von Cystein plus Stickstoff in wäßriger Suspension war die Vorbehandlung der Konidien die gleiche wie in den Einzelversuchen mit Cystein bzw. mit Stickstoff: 10 Minuten vor der Bestrahlung wurden die Konidien in 0,05 mol Cysteinlösung suspendiert, und 5 Minuten vor und während der gesamten Bestrahlung wurde durch die Suspension reiner Stickstoff geblasen. Nach der Bestrahlung erfolgte zweimaliges Waschen mit sterilem destilliertem Wasser und anschließend — wie oben beschrieben — die Verdünnung und das Ausplattieren. Bei der Auswertung dieser Versuchsserien zeigte sich, daß durch die Kombination von Cystein und Stick-

stoff ein höherer Schutzeffekt gegen die Inaktivierung durch ionisierende Strahlen erzielt wurde als in den Versuchen, in denen nur jeweils eines dieser Agentien zur Anwendung kam. Der mittlere Dosisreduktionsfaktor, bei Anwendung von Cystein und Stickstoff, beträgt — bezogen auf die Inaktivierung in wäßriger Suspension — rund 2,7. Die Inaktivierungskurve selbst ist wiederum vom Typ einer Mehrtrefferkurve. Die Neigung des linearen Teils der Kurve errechnete sich zu $b = -0,01$, als Extrapolationswert wurde $n = 1,1$ erhalten (Abb. 6).

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Schutzwirkung von Bouillon und Cystein in kombinierter Anordnung bestimmt. Folgende Versuchstechnik erwies sich als brauchbar: 10 Minuten vor der Bestrahlung Aufschwemmung der Konidien in einer 4%igen Bouillonlösung, in der Cystein in 0,05molarer Konzentration gelöst war. Während der Bestrahlung sorgte ein schwacher Luftstrom für Turbulenz in der Suspension. Nach der Bestrahlung schloß sich ein zweimaliges Waschen der Konidien mit sterilem Aqua dest. an. Eine Veränderung der Bouillon-Cystein-Lösung wurde während der Behandlungszeit (maximal 30 Minuten) nicht beobachtet. Auch in dieser Versuchsanordnung zeigte es sich, daß die beiden Schutzstoffe in Kombination einen höheren Schutzeffekt gegen die Inaktivierung liefern als jeweils nur einer der beiden Stoffe allein. Der aus dieser Versuchsserie ermittelte Dosisreduktionsfaktor — bezogen auf die Inaktivierung in reiner wäßriger Suspension — beträgt etwa 2,7. Die Inaktivierungskurve zeigt wiederum den typischen Verlauf einer Mehrtrefferkurve; die Neigung des linearen Teils ist $b = -0,0103$. Der Extrapolationswert liegt bei $n = 1,2$ (Abb. 6).

Diskussion der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Experimente soll zuerst die Frage diskutiert werden, inwieweit die Inaktivierung der Konidien mit einer Wirkung auf die in verschiedener Anzahl vorhandenen Zellkerne korreliert werden kann, d. h., ob eine direkte Beziehung zwischen der Kernzahl pro Konidium und aus der Dosiseffekt-kurve ableitbarer Treffbereichszahl vorliegt. Betrachten wir zunächst die Resultate aus den Versuchen mit den Stämmen Y 74 A (Makrokonidien) und Y 8743 (Mikrokonidien) in reiner wäßriger Suspension. Die Inaktivierungskurven aus den Versuchen mit Konidien der beiden Stämme sind vom Typ einer Mehrtrefferkurve. Als Extrapolationswert wurde für Y 74 A $n \approx 1,2$ gefunden. In der benutzten formalen Auswertung von Mehrtrefferkurven ergibt der Extrapolationswert die „Treffbereichszahl“, d. h. die Anzahl von „Treffbereichen“, die in einem Individuum je einmal getroffen werden müssen, damit es inaktiviert wird. Eine formale Analyse der Inaktivierungskurve bei Y 74 A würde also zu dem Ergebnis führen, daß zur Inaktivierung eines Konidiums im Mittel 1,2 Treffbereiche getroffen werden müssen. Die mittlere Anzahl Zellkerne pro Konidium beträgt bei diesem Stamm $\bar{K} = 1,42$. Eine Differenz zwischen Treffbereichszahl und Kernzahl ist zwar vorhanden, berücksichtigt man aber die unvermeidliche biologische Variabilität, so läßt sich in diesem Fall vielleicht auf eine numerische Übereinstimmung zwischen der mittleren Kernzahl und der Treffbereichszahl schließen und annehmen, daß ein Konidium dann inaktiviert wäre, wenn jeder Kern dieses Konidiums mindestens einmal getroffen würde.

Anders liegen die Verhältnisse bei dem Mikrokonidienstamm Y 8743. Hier wurde ein Extrapolationswert von $n \approx 3,6$ gefunden. Mikrokonidien sind aber immer einkernig, so daß eine klare Diskrepanz zwischen Kernzahl und dem aus

der formalen Analyse bestimmten Wert der „Treffbereichszahl“ pro Konidium besteht. Der gleiche Schluß ergibt sich, wenn man die Resultate aus den Bestrahlungsversuchen mit Konidien der beiden Stämme W 2/49 A und K 3/17 zur Diskussion heranzieht. In beiden Fällen wurden Dosiseffektcurven erhalten, die sich formal als modifizierte Eintrefferkurven auffassen lassen, wobei im Falle von W 2/49 A eine starke Variabilität der Strahlensensibilität die Ursache für die starke Krümmung der Kurve sein könnte. Beide Stämme produzieren Makrokonidien, die durchschnittliche Anzahl Kerne pro Konidium beträgt bei W 2/49 $\bar{K} \approx 1,7$ und bei K 3/17 $\bar{K} \approx 2,0$, also wiederum eine klare Diskrepanz zur formalen Analyse, die zur Treffbereichszahl 1 führt.

Die aus den Versuchen über die Inaktivierung getrockneter Konidien der Stämme W 2/49 A, Y 74 A und Y 8743 durch Röntgenstrahlen erhaltenen Dosiseffektcurven sind grundsätzlich vom gleichen Typ wie die aus den Bestrahlungsversuchen mit wäßrigen Konidiensuspensionen erhaltenen Kurven: für W 2/49 A eine modifizierte Eintrefferkurve, für die beiden anderen Stämme Mehrtrefferkurven. Im Vergleich mit den Ergebnissen, die bei der Bestrahlung wäßriger Konidiensuspensionen erhalten wurden, zeigen die Inaktivierungskurven getrockneter Konidien einen deutlichen Dosisreduktionsfaktor, der bei den einzelnen Stämmen verschieden groß ist: W 2/49 A etwa 2,5, Y 74 A etwa 2,1 und Y 8743 etwa 6. In dem Dosisreduktionsfaktor drückt sich ein „Schutzeffekt“ gegen die Inaktivierung durch Röntgenstrahlen aus. Bei der Deutung dieses Befundes kann man an folgende Interpretation denken: Bei der Bestrahlung einer wäßrigen Suspension werden die Konidien inaktiviert durch additive Überlagerung direkter und indirekter Effekte. Direkte Effekte sind die Folge einer unmittelbaren Einwirkung der Strahlungsenergie auf die biologischen Strukturen. Indirekte Effekte kommen dadurch zustande, daß die Energie zunächst im Wasser absorbiert wird, wobei diffusible Agentien gebildet werden, die dann an sensible Stellen der Zelle gelangen und sie schädigen können. Im getrockneten Zustand sind diese indirekten Effekte weitgehend eliminiert, so daß bei der Erzeugung der Schädigung lediglich die „direkten Treffer“ eine Rolle spielen würden.

Zum Schluß seien die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche mit Cystein und anderen Zusätzen besprochen. Bei allen drei getesteten Stämmen (W 2/49 A, Y 74 A und Y 8743) wurde wieder der gleiche Verlauf der Dosiseffektcurven gefunden, wie er bereits von den Bestrahlungsversuchen mit wäßrigen Suspensionen und mit getrockneten Konidien her bekannt ist: für W 2/49 A eine modifizierte Eintrefferkurve, für Y 74 A und für Y 8743 Mehrtrefferkurven. Bei allen drei getesteten Stämmen wird durch Zusatz von Cystein zu der reinen wäßrigen Suspension ein Schutzeffekt gegen die Inaktivierung durch Röntgenstrahlen erzielt. Der Dosisreduktionsfaktor ist bei den einzelnen Stämmen auch wieder verschieden hoch. Er beträgt, bezogen auf die reine wäßrige Suspension, für W 2/49 A etwa 2,2, für Y 74 A etwa 1,8 und für Y 8743 etwa 1,3. Vergleicht man die Höhe des Schutzeffektes, der durch Trocknung erzielt wird, mit dem durch Cystein erreichten, so fällt auf, daß bei den Stämmen W 2/49 A und Y 74 A der Cysteinschutzeffekt zwar etwas niedriger liegt als der Schutzeffekt, der durch Trocknung erzielt wird, zwischen beiden Größen besteht aber keine signifikante Differenz. Bei dem Stamm Y 8743 (Mikrokonidien) dagegen ist der Cysteinschutzeffekt wesentlich geringer als der durch Trocknung hervorgerufene Effekt. Bei der Bestrahlung in Bouillon sollen indirekte Effekte durch

im Wasser bei Bestrahlung entstehende diffusible Agentien weitgehend eliminiert sein. Bei unseren Bestrahlungsversuchen, die mit Konidien der Stämme Y 74 A und Y 8743 ausgeführt wurden, ergab sich durch Suspension der Konidien in Bouillon ein gleich hoher Schutzeffekt, wie er durch Zusatz von Cystein zu der wäßrigen Suspension erzielt wurde.

Für den Wirkungsmechanismus des Cysteins wurden unter anderen folgende beide Möglichkeiten diskutiert: 1. Die bei Bestrahlung der belüfteten wäßrigen Suspensionen im Wasser gebildeten hochreaktiven Radikale werden durch Reaktionen mit den Cysteinmolekülen inaktiviert (*Konkurrenzreaktion*). — 2. Gray (1955) hat gezeigt, daß durch Zusatz von Cystein zu Wasser die O_2 -Konzentration in der Lösung innerhalb kurzer Zeit auf sehr niedrige Werte sinkt. Der Schutzeffekt des Cysteins würde dann auf einer Entfernung des O_2 aus der Suspension beruhen und tatsächlich einen „maskierten“ O_2 -Effekt darstellen. In diesem Zusammenhang führten wir die Versuche mit O_2 am Stamm Y 74 A durch. Bei Entfernung des O_2 aus der Suspension während der Bestrahlung wurde ein gleich hoher Schutzeffekt erzielt wie durch Cystein, Bouillon oder Trocknung. Nun ist bekannt, daß bei der Bestrahlung von O_2 -freiem Wasser mit Röntgenstrahlen bestimmte Typen von Radikalen nicht gebildet werden. Es liegt daher nahe, den durch N_2 hervorgerufenen Schutzeffekt („Sauerstoffeffekt“) auf die Abwesenheit dieser Radikale zurückzuführen.

Abschließend sollen noch kurz die Bestrahlungsversuche behandelt werden, bei denen verschiedene Schutzagentien kombiniert wurden. Bei diesen Versuchen wurden nur Konidien des Stammes Y 74 A verwendet. In beiden Versuchsreihen (N_2 + Cystein bzw. Bouillon + Cystein) wurden wiederum Mehrtrefferkurven erhalten, wie sie bereits von den anderen bisher besprochenen Versuchsanordnungen her bekannt sind. In beiden Versuchsreihen wurde ein gleich hoher Schutzeffekt durch die Kombination von Cystein mit N_2 bzw. mit Bouillon erzielt; der Dosisreduktionsfaktor beträgt etwa 2,7. Eine einfache Addition des Schutzeffektes der einzelnen Agentien liegt somit nicht vor, da man dann einen Dosisreduktionsfaktor gleich dem Produkt der Dosisreduktionsfaktoren der entsprechenden einzelnen Schutzagentien erwarten würde. Tatsächlich liegt der ermittelte Dosisreduktionsfaktor aber unter diesem hypothetischen Wert.

Zusammenfassung

Es wurden Konidien mehrerer Stämme von *Neurospora crassa* mit Röntgenstrahlen bestrahlt, und die strahleninduzierte Inaktivierung der Konidien wurde bestimmt. Dabei zeigte sich, daß für jeden dieser Stämme charakteristische Dosiseffektkurven erhalten werden. Eine Übereinstimmung zwischen der mittleren Anzahl der Zellkerne pro Konidium (bei den einzelnen Stämmen) und der Treffbereichszahl, die aus den Dosiseffektkurven extrapoliert werden kann, ließ sich nicht herleiten. Durch Trocknung der Konidien wird ein Schutzeffekt gegen die strahleninduzierte Inaktivierung erzielt. Wahrscheinlich beruht dieser Schutzeffekt auf einer weitgehenden Eliminierung der indirekten Effekte. Durch Zusatz von Cystein zu einer wäßrigen Konidien suspension wird ebenfalls ein Schutzeffekt gegen die strahleninduzierte Inaktivierung bewirkt. Ein gleich hoher Schutzeffekt wird durch Zugabe von Bouillon bzw. durch Einleiten von Stickstoff erzielt. Bei Kombination von Cystein und Bouillon bzw. mit Stickstoff wird ein „Hyperschutzeffekt“ beobachtet.

Summary

Conidia of several strains of *Neurospora crassa* were irradiated with x-rays and the radiation induced inactivation of the conidia was determined. Thereby it was shown,

that characteristic dose-effect curves were obtained for each of these strains. No agreement between the mean number of the nuclei pro conidium (of the various strains) and the numbers of targets, which can be extrapolated from the dose-effect curves, could be derived. A protective effect against a radiation-induced inactivation is attained by drying the conidia. Probably this protection effect arises from an extensive elimination of the indirect effects. Through the addition of cysteine to an aqueous suspension of conidia a protection effect against the radiation induced inactivation is likewise brought about. A similar high protection effect is also attained through addition of broth, resp. through the introduction of nitrogen. By combining cysteine with broth resp. with nitrogen a "hyperprotection" effect is observed.

Résumé

On a déterminé l'inactivation après irradiation de conidies de plusieurs souches de *Neurospora crassa* par des courbes d'effet-dose qui se sont révélées caractéristiques pour chaque souche. On a pu dégager un rapport entre le nombre moyen de noyaux cellulaires par conidium (pour chaque souche) et le nombre de cibles pouvant être extrapolés des courbes doses-effets. Le dessèchement des conidies permet d'obtenir un effet protecteur contre l'inactivation par irradiation. Il est probable que cet effet protecteur repose sur une large élimination des effets indirects. L'addition de cystéine à une suspension aqueuse de conidies confère également un effet protecteur contre l'inactivation. Un effet protecteur analogue est obtenu par addition de bouillon et par introduction d'azote. En combinant la cystéine au bouillon et à l'azote on observe un effet "hyperprotecteur".

Schrifttum

Atwood, K. C., u. F. Mukai: Amer. Nat. 88 (1954): 295. — Atwood, K. C., u. A. Norman: Proc. Nat. Acad. Sci. 35 (1949): 696. — Gafford, R. D.: Radiat. Res. 9 (1958): 248. — Giles jr., N. H.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XVI (1951): 283. — Gray, L. H.: Progr. in Radiobiol. Cambridge 1955: 267. — Hollaender, A., u. G. E. Stapleton: Physiol. Rev. 33 (1953): 77. — Kolmark, G., u. M. Westergaard: Hereditas 39 (1953): 209. — Latarjet, R., u. E. Ephrati: C. R. Soc. Biol. 142 (1948): 497. — Westergaard, M., u. H. K. Mitchell: Amer. J. Bot. 34 (1947): 573.